干扰素在肝癌细胞 Huh7.0 中诱导 SAMHD1 抑制 HBV 复制*

乔淼　胡杰　毛彬力　皮思蝶　胡源**

（重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室重庆　400016 ）

摘要 目的：研究干扰素调节宿主限制性因子 SAMHD1 的表达而抑制 HBV 复制的分子机制。方法：首先不同剂量的干扰素α、β和γ处理 Huh7.0 细胞，通过荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 SAMHD1 在转录和翻译后的表达水平；进一步通过 siRNA 干扰内源性的 SAMHD1，再评价干扰素α、β对病毒的抑制效应；最后通过免疫荧光检测了干扰素α诱导内源性 SAMHD1 的细胞定位及 Southern blot 检测了 SAMHD1 细胞定位对病毒复制的影响。结果：在 Huh7.0 细胞中，SAMHD1 的 RNA 水平和蛋白表达明显受干扰素α和β的诱导升高；干扰 SAMHD1 后干扰素α和β对 HBV 复制的抑制作用消失；SAMHD1 定位在细胞核内，干扰素α诱导 SAMHD1 同样定位在细胞核内，缺失核定位信号后 SAMHD1 丧失了其抑制病毒复制的作用。结论：在 Huh7 细胞中，干扰素α、β能诱导 SAMHD1 表达上调来抑制 HBV 的复制，SAMDH1 的抗病毒作用依赖于其细胞定位。

关键词 乙型肝炎病毒　干扰素　SAMHD1　抑制

中图分类号 Q789

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染是一个重要的全球健康问题，全球范围内有大约 2.4 亿人感染乙肝病毒[1]，乙肝病毒慢性感染可导致肝硬化、肝衰竭和肝癌[2]。目前治疗治疗慢性乙肝的药物主要为核苷酸类似物和干扰素(Interferons,IFNs)[3]。核苷酸类似物治疗由于 HBV 耐药突变株的出现，效果常常不能持久；而干扰素 (Interferons,IFNs) 作为乙肝治疗中一种常用的抗病毒药物,可以诱导多种抗病毒蛋白表达发挥其抗病毒作用，因此寻找干扰素诱导的效应基因并解析其抗病毒机制具有非常重要的意义。

SAMHD1（Sterile alpha motif (SAM) and histidine/ aspar aciticd(HD) domain -containing protein 1）是一种重要的细胞内天然免疫因子[4-6]，能够抑制逆转录病毒（如 HIV-1[7]）和 DNA 病毒（如 HSV-1[8]）的复制，主要

*国家自然科学基金资助项目（81471945）;重庆市科委自然科学基金项目(cstc2018jcyjAX0166）; 重庆市教委重庆市青少年创新人才培养雏鹰计划（第七期）.

**通信作者：胡源，副研究员，电子邮箱：tottyhy@163.com

通过降解病毒复制需要的 dNTP 原料来有效抑制病毒的复制。最近报道 HBV 作为逆转录病毒，SAMHD1 可通过其磷酸水解酶活性抑制病毒的复制[9]。

最近报道在 U87-MG[10]、HEK293T 、HeLa[11]和原代单核细胞[12]中，IFN-α 可以诱导 SAMHD1 蛋白的表达上调, 而在肝癌细胞中 SAMHD1 受干扰素调控而抑制 HBV 复制报道较少，因此本文中我们主要探索了干扰素诱导 SAMHD1 对于其抗毒作用的效应以及 SAMHD1 抗病毒作用是否依赖于其细胞定位。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞 Huh7.0 细胞由实验室保存；胎牛血清来自 BI 公司，DMEM 培养基、丙酮酸钠及青-链霉素购自 Hyclone 公司；Takara 公司购买逆转录试剂盒；siRNA 由上海吉玛公司合成；SAMHD1 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司 HA 抗体、Alexa Fluor® 488 和 Alexa Fluor® 647 购自 Thermo Fisher Scientific 公司购买 HA 抗体； SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、山羊血清、GAPDH 抗体、DAPI 染色液、抗荧光淬灭封片液购自碧云天公司；SANTA CRUZ 购买β-Actin 抗体；中杉金桥购买鼠和兔二抗；Dako 公司购买 HBc 抗体；Roche 公司购买 DIG 探针标记检测试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、Nylon 膜；Invitrogen 公司购买脂质体 3000 转染试剂；美国 Millpore 公司购买 PVDF 膜、Western 显色底物；柯达公司购买胶片、显影液、定影液；

1.2 方法

1.2.1 质粒构建和细胞培养

SAMHD1 表达质粒是由北京义翘神州生物基因公司构建，cDNA 序列(NM_015474.3)克隆到 pcDNA3.1 载体，羧基端带有 HA 标签。Huh7 细胞、HEK293T 细胞培养采用 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，37℃，5% CO_2 条件下培养。质粒转染、siRNA 干扰按照 invitrogen 公司的 lipo3000 转染试剂说明书操作。

表 1.SAMHD1 的定点突变引物序列和特异性 siRNA 干扰序列

Table 1. Sequence of primers for site-directed mutagenesis and siRNA target for SAMHD1

引物	序列（5’→3’)
SAMHD1-D11-14 FP	CGATTCCGAGCAGCCCTCCTGCGATGACA
SAMHD1-D11-14 RP	TGTCATCGCAGGAGGGCTGCTCGGAATCG
SAMHD1-D207N FP	GCTGGACTTTGTCATAATCTCGGTCATGGGCC
SAMHD1-D207N RP	GGCCCATGACCGAGATTATGACAAAGTCCAGC
siSAMHD1FP:	GCAGCCAACAGGACAAAUATT
siSAMHD1RP:	UAUUUGUCCUGUUGGCUGCTT

1.2.2 免疫荧光检测 SAMHD1 在细胞中的定位

6 孔板中放入 10×10mm 灭菌玻片后，PBS 洗两遍。种细胞于 6 孔板中，待细胞贴壁后，第一组通过 IFN-α诱导 SAMHD1 内源表达，第二组过表达 HA-SAMHD1 及 HA-SAMHD1 核定位缺失(D11-14)质粒，48h 后对细胞进行处理。条件为：PBS 洗后用 4%多聚甲醛固定 25min，含 0.15% Triton X-100 的 PBS 通透处理 10min，山羊血清室温封闭 30min 后，IFN-α诱导组滴加 100μl 山羊血清稀释的 SAMHD1 抗体（1:100），过表达 HA-SAMHD1 及 HA-SAMHD1 核定位缺失组滴加 100ul 山羊血清稀释后的 HA 抗体(1:100)，4℃湿盒中孵育过夜。IFN-α诱导组加 Alexa Fluor 647 标记的山羊抗兔 IgG 荧光二抗（1:500），过表达 HA-SAMHD1 及 HA-SAMHD1 核定位缺失组加 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 荧光二抗(1:500) 室温孵育 2h，DAPI 染核，抗荧光淬灭封片液封片后在共聚焦显微镜下观察。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测干扰素处理后 SAMHD1 的表达

细胞通过干扰素α、β、γ诱导处理 2 天后用 TRIzol 法提取 mRNA[13]，逆转录为 cDNA，通过荧光定量 PCR[14]检测 SAMHD1 的 mRNA 水平变化情况。

1.2.4 Western blot 检测不同处理后的 SAMHD1 的表达

干扰素α、β、γ处理细胞，SAMHD1 的 siRNA 干扰、以及过表达 SAMHD1 处理 3 天后用 RIPA（含 10%cocktail）裂解液裂解细胞提取蛋白。12% SDS-PAGE 电泳后，转膜至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭 2h，分别加入 SAMHD1 T592 位点磷酸化抗体（#15038，CST 公司）、抗 HA 小鼠抗体(AH158，碧云天)、β-actin (TA-09，中杉金桥)于 4℃孵育过夜。第二天 TBST 洗涤 4 次，每次 5min，然后加入山羊抗兔或小鼠的二抗孵育 1h，最后采用 ECL 进行荧光显色，柯达胶片收

集荧光信号。

1.2.5 病毒核心颗粒 DNA 的提取

采用蔗糖密度梯度离心法提取病毒核心颗粒中 HBV DNA[15]：转染 3 天后，细胞用 CPLB 裂解液(10mMTris-HCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 2%蔗糖)裂解后，10000rpm 离心 5min，上清液用微管酶(Micrococcal Nuclease, M’Nase)37℃消化 1h，然后在 30%蔗糖密度介质中，45000rpm 超速离心 2h 提取病毒颗粒，蛋白酶 K 消化过夜后用酚/氯仿/异戊醇抽提，乙醇沉淀得到 HBV DNA。

1.2.6　Southern Blot 检测 HBV 的复制水平

1.2%琼脂糖凝胶电泳 70min，碱变性后转膜至 Nylon 膜上，紫外交联固定 DNA 后，采用地高辛标记的 DNA 杂交试剂盒进行，与地高辛抗体进行杂交后显影。

1.3　统计学分析

以上统计数据由 SPSS 19.0 软件处理，数据采用单因素方差分析。当双侧显著性水平 $P<0.05$ 时认为有统计学差异。

2　结果

2.1 干扰素处理后 SAMHD1 的表达

我们首先探索了干扰素α、β、γ对 SAMHD1 的诱导效应：肝癌细胞 Huh7.0 分别用不同剂量的干扰素α、β、γ诱导处理 48h 后，分别通过荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 SAMHD1 RNA 和蛋白的表达水平，结果表明：干扰素α和β处理后，SAMHD1 的蛋白表达水平明显随其剂量的增加而显著增加。与对照组相比，干扰素α 2000U/ml 剂量处理后，SAMHD1 的 mRNA 和蛋白水平分别上调 6 和 17.5 倍，干扰素β在 20U/ml 剂量处理后，SAMHD1 的 mRNA 和蛋白水平分别上调 10 和 7.2 倍，而干扰素γ处理后，SAMHD1 的 mRNA 和蛋白水平没有明显上调（图 1），表明 SAMHD1 主要受到 I 型干扰素的诱导上调。

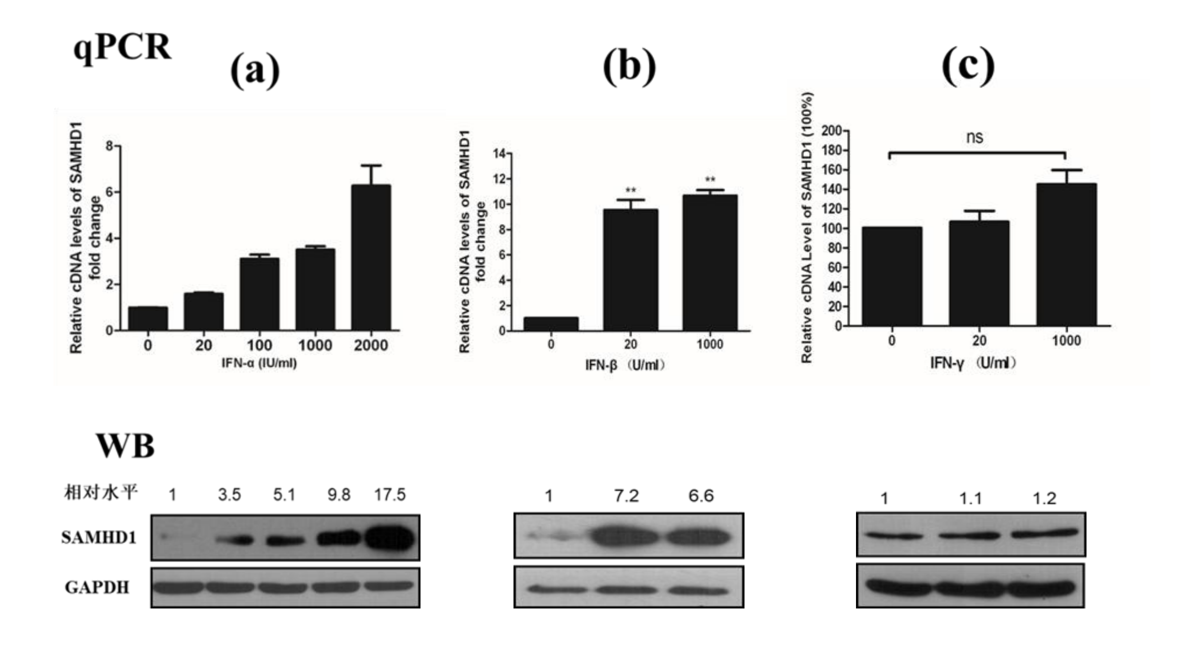


图 1 肝癌细胞 Huh7.0 中干扰素α、β、γ的 SAMHD1 的诱导效应

Fig.1　Interferon α、β、γ induce SAMHD1 expression in Huh7.0 cells

2.2　沉默 SAMHD1 后拮抗干扰素α、β对 HBV 的抑制作用

我们进一步通过 siRNA 沉默内源性 SAMHD1 的表达后，分析在干扰素α、β对 HBV 的抑制作用：首先我们确定了 siRNA 特异性干扰内源性 SAMHD1 的表达，SAMHD1 基因 RNA 水平下降了 67%（图 2 a）；同样在 Huh7.0 细胞中先特异性干扰 SAMHD1 后，转染 HBV 复制质粒后再分别加入干扰素α (1000U/ml) 和β (20U/ml) 处理，72 小时后提取病毒核心颗粒 DNA，通过 Southern blot 检测 HBV 复制水平（图 2b）。结果表明：与对照组相比，干扰内源性 SAMHD1 后（干扰效率为 65%），HBV 复制水平显著增加 2.3 倍（图 2b，比较泳道 1 和 2），表明内源性 SAMHD1 能够抑制 HBV 复制；干扰素α或干扰素β处理后，HBV 复制显著下降（图 2B，比较泳道 1 和 3 或泳道 1 和 5），但是沉默内源性的 SAMHD1 表达后，干扰素α和干扰素β抑制 HBV 复制的作用明显减弱，表明干扰素α和干扰素β抑制 HBV 复制的作用依赖于内源性的限制性因子 SAMHD1。

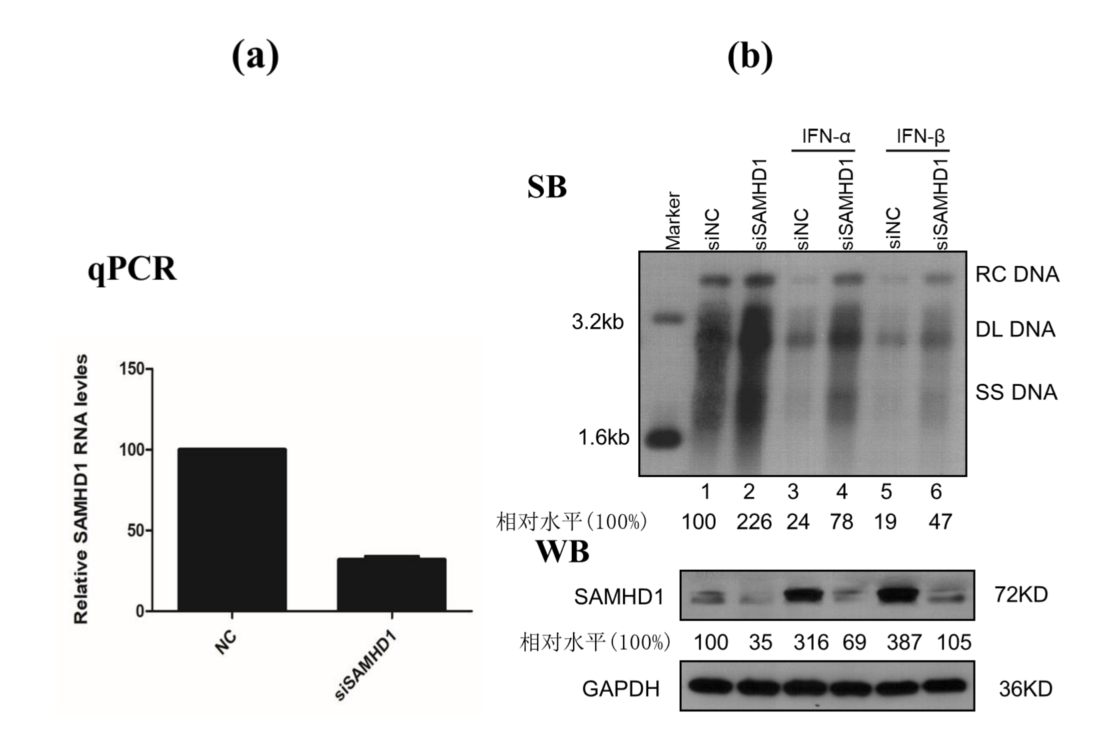


图 2 干扰 SAMHD1 后 IFNα、β对 HBV 的抑制作用

Fig.2 Effect of SAMHD1 knockdown on inhibition of IFN α、β toward HBV

RC:松弛环状 DNA；DL:线性双链 DNA；SS:单链 DNA

2.3 SAMHD1 抑制 HBV 依赖于其细胞定位

为了进一步明确干扰素α、β诱导 SAMHD1 的细胞定位及其抗病毒作用是否依赖于其细胞定位，首先通过免疫荧光检测了 SAMHD1 在 Huh7.0 的细胞定位：无论是干扰素诱导内源性的 SAMHD1 还是过表达 SAMHD1，均定位在细胞核内(图 3A、B)，而缺失核定位信号 (NLS)的突变蛋白则定位于细胞质中(图 3C), 与 Rice、A.Brandariz-Nuñez 等人的研究一致[16-17]。

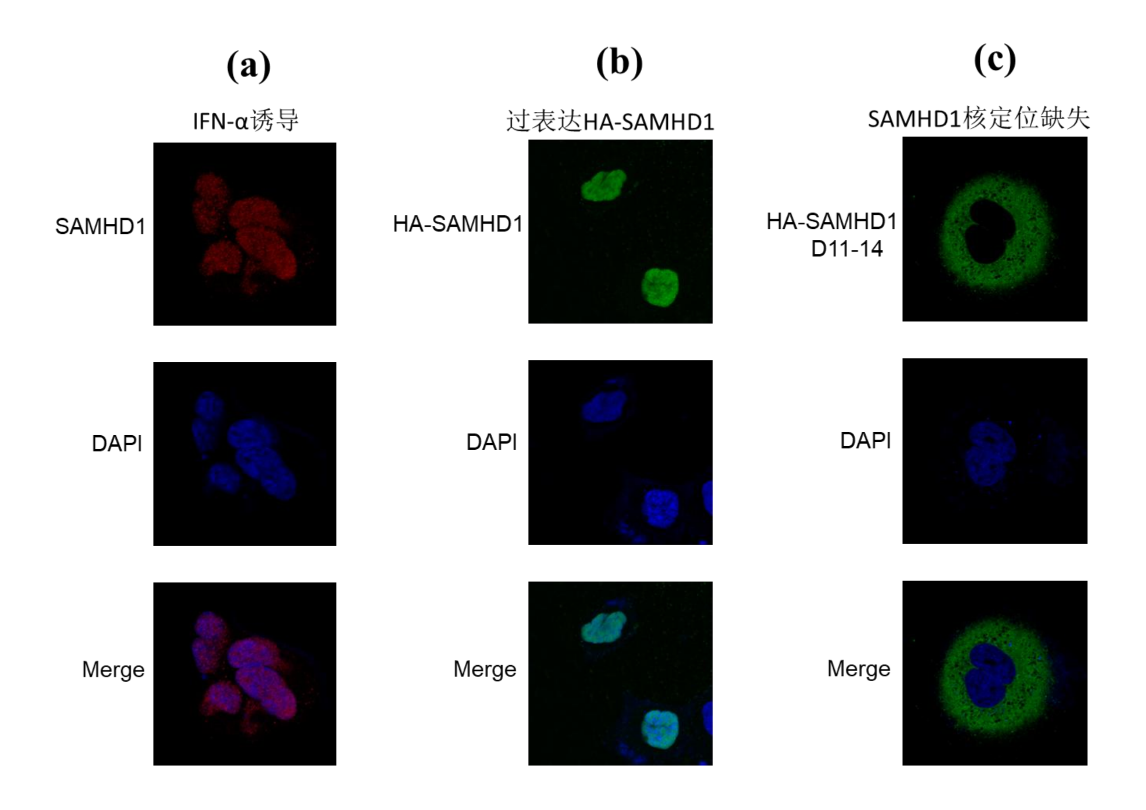
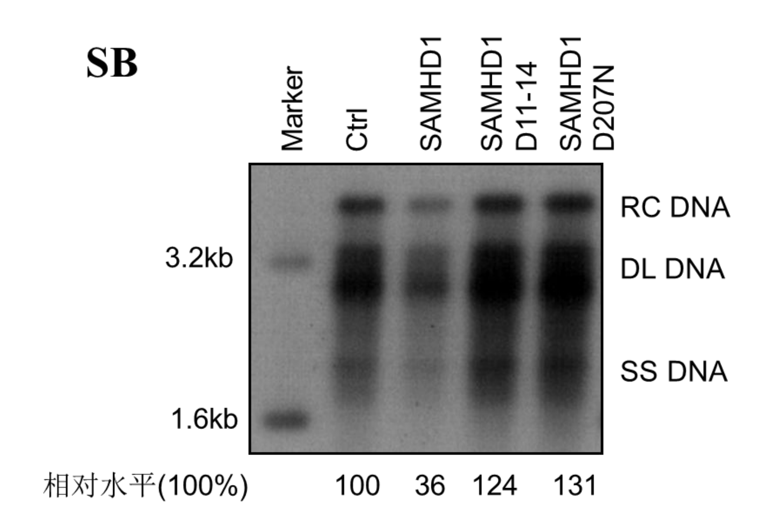


图 3 免疫荧光试验检测 SAMHD1 及核定位缺失的定位

Fig.3 Distribution of SAMHD1 wide type and NLS deletion mutant

我们进一步分析了 SAMHD1 的细胞定位对其抗病毒作用的影响：利用 HBV 复制转染体系，Huh7 细胞中共转染 HBV 复制质粒和 SAMHD1 的野生型或突变体，提取病毒核心颗粒后检测病毒复制水平，与对照相比，缺失 NLS 的 SAMHD1 突变蛋白 D11-14 丧失了其抗病毒作用（图 4）。



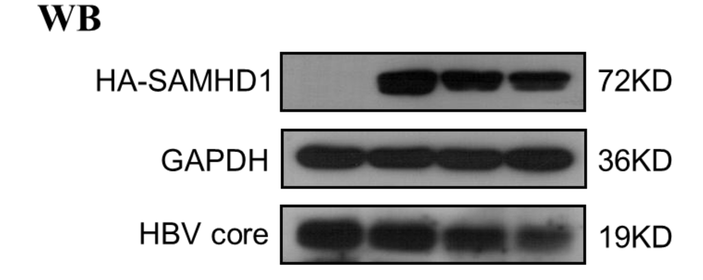


图 4 SAMHD1 抑制 HBV 复制依赖于细胞定位

Fig. 4 Inhibition of SAMHD1 and its NLS mutation on HBV

RC:松弛环状 DNA；DL:线性双链 DNA；SS:单链 DNA

3 讨论

干扰素作为慢性乙肝治疗中一种常用的抗病毒药物[2]，其机制可通过多种干扰素诱导基因, 在病毒的复制环节发挥抗病毒作用，但是其具体机制尚不是很清楚。SAMHD1 是可抑制逆转录病毒复制的宿主限制性因子[18-20]，最近研究表明 SAMHD1 也能通过消耗细胞内 dNTPs 来抑制单纯性疱疹病毒及乙型肝炎病毒的复制[8,9]。同时 SAMHD1 可被干扰素诱导表达，因此本研究拟进一步分析干扰素诱导 SAMHD1 发挥抗病毒作用的效应和机制。

我们发现 I 型干扰素α、β在肝癌细胞 Huh7 中可以诱导 SAMHD1 的 RNA 水平和蛋白水平表达上调，暗示 I 型干扰素在肝细胞中通过诱导 SAMHD1 的表达发挥其抑制 HBV 复制的作用，但在 SAMHD1 对 HIV-1 的抗病毒效应中，研究

表明 IFN 处理活化的 CD4 + T 细胞，单核细胞衍生的巨噬细胞（MDM）和单核细胞衍生的树突细（MDDCs）可诱导 SAMHD1 的去磷酸化而发挥抗病毒作用[21]。因此干扰素诱导 SAMHD1，发挥其抗病毒作用在不同的细胞系是不一样的。

进一步干扰 SAMHD1 后，干扰素对 HBV 的抑制作用消失，表明 SAMHD1 可作为 I 型干扰素的诱导基因发挥抗病毒作用。此外，我们进一步分析了 SAMHD1 的核定位区对其抗病毒作用的影响，结果表明 SAMHD1 核定位缺失突变后丧失了其抗病毒作用，表明 SAMHD1 的抗病毒作用依赖于细胞定位，这将有利于后续深入研究干扰素对 HBV 的抑制机制以及靶向筛选抑制 HBV 的药物。

[1] Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk R T, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. Lancet, 2015, 386(10003):1546-1555.

[2] Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, et al. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathol Biol, 2010, 58(4): 267-272.

[3] Bertoletti A,Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. Gut,2012,61(12): 1754-1764.

[4] Chen Z, Zhang L, Ying S. SAMHD1: a novel antiviral factor in intrinsic immunity. Future Microbiology, 2012, 7(9):1117-1126.

[5] Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic-and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. Nature, 2011, 474(7353):654-657.

[6] Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. Nature, 2011, 474(7353):658-661.

[7] Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. Nat Immunol, 2012,13(3):223-228.

[8] Kim ET, White TE, Brandariz-Núñez A, et al. SAMHD1 restricts herpes simplex virus 1 in macrophages by limiting DNA replication. J Virol, 2013, 87(23):12949-12956.

[9] Jeong G U, Park I H, Ahn K, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by a dNTPase-dependent function of the host restriction factor SAMHD1. Virology, 2016, 495:71-78.

[10] Goujon Caroline, Schaller Torsten, GalãoRuiPedro,et al. Evidence for IFNα-induced, SAMHD1-independent inhibitors of early HIV-1 infection. Retrovirology, 2013,10(1):23. doi:10.1186/1742-4690-10-23.

[11] Gelais C S, Silva S D, Amie S M, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4 + T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons. Retrovirology , 2012, 9(1):1-15.

[12] Berger A, Sommer A F, Zwarg J, et al. SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutières syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection. Plos Pathogens, 2011, 7(12):e1002425.

[13] Rio D C, Ares M, Hannon G J, et al. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). Cold Spring Harbor Protocols, 2010, 2010(6):pdb.prot5439.
[14] Bustin S A, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clinical Science, 2005, 109(4):365.
[15] Hu Y, Cheng X, Cao F, et al. beta-Thujaplicinol inhibits hepatitis B virus replication by blocking the viral ribonuclease H activity. Antiviral Res, 2013, 99(3): 221-229.
[16] Rice GI, Bond JAsipu A. Mutations involved in Aicardi-Goutieres syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. Nature genetics, 2009, 41(7):829.
[17] Brandariz-Nuñez A, Valle-Casuso J C, White T E, et al. Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac. Retrovirology, 2012, 9(1):49. http://dx.doi.org/10.1186/
[18] White T E, Brandariznuñez A, Vallecasuso J C, et al. Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1. Virology, 2013, 436(1):81-90.
[19] Gramberg T, Kahle T, Bloch N, et al. Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1. Retrovirology, 2013, 10(1):26. http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-10-26
[20] Sze A, Belgnaoui S M, Olagnier D, et al. Host restriction factor SAMHD1 limits human T cell leukemia virus type 1 infection of monocytes via STING-mediated apoptosis. Cell Host & Microbe, 2013, 14(4):422-434.
[21] Cribier A, Descours B, Valadão A L, et al. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1.[J]. Cell Reports, 2013, 3(4):1036-1043.

The inhibition of IFN induce SAMHD1 to the replication of HBV in Huh7.0 cells

QIAO Miao HU Jie MAO Bin-Li PI Si-Die HU Yuan**

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Objective: To analyze the mechanism of the inhibition of IFNs induce SAMHD1 to hepatitis B virus（HBV）in liver cancer cells Huh7.0. Methods:（1）Recombiant expression plasmids of SAMHD1 (sterile alpha motif and histidine/ aspartic acid domain-containing protein 1) mutants that were defective in dNTPase (deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase) activity and its nuclear location mutation were constructed. （2）The mRNA and protein levels of SAMHD1 in Huh7.0 cells by IFNs treatment were measured by real time and Western blot.（3）HBV core-associated DNA levels in transfected Huh7.0 cells were measured by Southern blot.（4）The location of SAMHD1 and its nuclear mutation in the Huh7.0 cells was measured by immunofluorescence. Results: （1） Both the RNA and protein levels of SAMHD1 were

**通信作者：胡源，副研究员，电子邮箱：tottyhy@163.com

upregulated by interferons . （2） The antiviral function of SAMHD1 was lost when knocking down the expression of SAMHD1 by siRNA.（3）SAMHD1 lost its restriction towards HBV after mutating its NLS signal. Conclusion：IFNs can upregulate the expressing of SAMHD1 in Huh7 cells. SAMHD1 is mainly located in the nucleus and its restriction towards HBV dependent on its location.

Key words　hepatitis B virus　interferons　SAMHD1　inhibition